

ВЫДЕЛЕНИЕ АСКОСПОР ДРОЖЖЕЙ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА БЕЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОМАНИПУЛЯТОРА

И. А. Захаров, С. Г. Инге-Вечтомов

Вегетативные клетки диплоидных дрожжей-сахаромицетов образуют в результате редукционного деления гаплоидные аскоспоры, которые остаются соединенными в оболочках асков. При прорастании споры копируют с восстановлением диплоидного состояния. Для анализа расщепления среди гаплоидного потомства гибридов, а также для получения односпоровых штаммов необходима изоляция отдельных спор. Для этого до недавнего времени использовалась исключительно микроманипуляционная техника, впервые предложенная Винге и Лаустсеном (Winge a. Laustsen, 1938). Изоляция спор этим методом и основанный на нем тетрадный анализ отличаются большой трудоемкостью, что особенно сказывается при работе с диплоидами с низкой жизнеспособностью аско-спор. Как показала наша работа по гибридизации видов *Sacch. globosus* и *Sacch. cerevisiae*, многие гибриды оказываются почти стерильными, а потому тетрадный анализ расщепления этих и им подобных гибридов вообще оказывается невозможным. Столь же затруднено из-за низкой жизнеспособности аско-спор выделение гаплоидных линий из многих производственных штаммов. Примером этого может служить широко известная XII раса *Sacch. cerevisiae*, у которой, по нашим данным, прорастает лишь около 0,7% аско-спор.

Все сказанное доказывает необходимость разработки специальных методов массового выделения аско-спор сахаромицетов. Пока единственным методом выделения аско-спор без манипулятора и отделения их от вегетативных клеток является метод Эмейса и Гуца (Emeis u. Gutz, 1958). Ими предложено разрушение асков с помощью гомогенизатора и экстрагирование аско-спор из суспензии добавлением жидкого парафина.

В настоящем сообщении описан простой метод, позволяющий выделить аско-споры дрожжей для получения гаплоидов и анализа расщепления среди односпоровых клонов. Предложенный метод основан на ферментативном разрушении оболочек асков, возможность чего была показана Джонстоном и Мортимером (Johnston a. Mortimer, 1959), и избирательном уничтожении вегетативных клеток спорующей культуры.

Материалом в наших опытах служили дрожжи инбредных Петергофских линий, полученных из XII расы *Sacch. cerevisiae* (Инге-Вечтомов, 1963). Они обладают высокой, до 90%, жизнеспособностью аско-спор и несут различные генетические маркеры, наследование которых изучено методами тетрадного анализа.

В международной номенклатуре генов дрожжей приняты цифровые индексы для обозначения фенотипически подобных, но неаллельных му-

таций. Не имея возможности выяснить аллельность использованных нами мутаций описанным другими авторами, мы или вводили оригинальную символику, или употребляли буквенные индексы.

Обозначение генетических маркеров, использованных в работе: a/a — принадлежность к типу старивания a или a , ad_1 — потребность в аденине, красный цвет колонии, ad_2 — потребность в аденине, красный цвет колонии, мутация, неаллельная предыдущей, lct — неспособность расти на среде с лактатом, генная мутация дыхательной недостаточности.

Полная среда, использованная в нашей работе, индикаторная среда с лактатом и среда для споруляции описаны в статье одного из нас (Захаров, 1961). В качестве минимальной использовалась среда следующего состава в процентах: глюкоза — 2, K_2HPO_4 — 0,2, $MgSO_4$ — 0,1, $(NH_4)_2SO_4$ — 0,1, агар — 2. Непосредственно перед посевом на поверхность минимальной средой были нанесены петлей растворы витаминов — тиамина и биотина.

Для разрушения оболочек асков применен стерильный пищеварительный сок улиток *Helix lucorum taurica* (Инге-Вечтомов, Захаров, 1964). Для получения сока улитку вскрывали, вырезали у нее зоб, собирали из зоба сок и разводили его дистиллированной водой в отношении 1:2, а затем стерилизовали фильтрованием. Стерильный сок сохраняли в холодильнике; для использования в опыте приготавливали разведение примерно 1:20.

Вегетативные клетки, находящиеся в спорующей культуре, убивали 33,6%-ным этиловым спиртом (смесь 96% спирта и воды в отношении 7:13).

Безусловно, работа предлагаемых методом может быть проконтролирована на примере следующего модельного опыта. Двухсуточную культуру диплоидов П8 генотипа $aa, ad_1 ad_2, lct lct$, выращенную на полной агаризованной среде, переносили на среду для споруляции. Через 2 суток культуру с образовавшимися асками суспензировали в 33,6%-ном спирте. При действии такой концентрации спирта в течение 1 ч аскоспоры сохраняют жизнеспособность, а вегетативные клетки гибнут. При этом по крайней мере на $17,5 \cdot 10^6$ клеток не удавалось обнаружить ни одной способной к росту.

После часового воздействия спирта клетки и аски осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин, и осадок дважды промывали дистиллированной водой. После промывки осадок суспензировали в растворе фермента пищеварительного сока улиток, и спорующие клетки переваривались при температуре $30^\circ 30$ мин, после чего прибирки с суспензией клеток в растворе фермента помещали на механическую качалку. Встряхивание производили в течение 1 ч при комнатной температуре. Микроскопирование таких суспензий показало, что значительное количество аскоспор после обработки освобождается из асков и разъединяется, однако в суспензии обычно остаются и неразъединенные аскоспоры и переваренные аски. Для того чтобы избавиться от них, а также от убитых спиртом диплоидных клеток, суспензию центрифугировали в течение 3 мин при 1000 об/мин. Число аскоспор в надосадочной жидкости определяли с помощью гематометра, и в соответствующем разведении суспензию спор высевали на чашки. Через 4—5 дней среди односпоровых клонов — потомков гибрида П8 — учитывали расщепление по потребности в аденине. Расщепление по другим признакам в этих опытах не учитывали. Данные двух повторностей опыта, приведенные в табл. 1, показывают, что соотношение белых (не нуждающихся в аденине) и красных (нуждающихся в аденине) колоний не отличалось от 1:1, что и ожидалось на основе моногенного наследования

Линии дрожжей, использованные в настоящей работе, для роста на минимальной среде нуждаются в добавке витаминов тиамина и биотина. При посеве гаплоида дикого типа 15В-П4 (тип спаривания *a*) на минимальную среду с биотином, но без тиамина удалось выделить спонтанные мутанты, не нуждающиеся в тиамине. На среде без тиамина вырастали колонии двух типов: гладкие и морщинистые, врастающие в агар. Один из морщинистых мутантов (15-15В-П4) был скрещен с линией 6-ПЗ (*a*, *ad_i*). В результате этого скрещивания был получен гибрид П67. Гибрид был отобран из рассева смешанной культуры гаплоидов по совмещению признаков обоих родителей — белой окраски и гладкой поверхности колонии. Признак «морщинистая колония» оказался, таким образом, рецессивным.

Описанным выше методом, при использовании в качестве селектора мутации красной окраски *ad_i*, в потомстве гибрида П67 было изучено расщепление по морфологии колонии. Соотношение гладких и морщинистых среди красных колоний в споровом потомстве гибрида П67 представлено в табл. 3. Это соотношение статистически достоверно не отличается от 1:1, на основе чего можно заключить, что признак «морщинистая колония» наследуется моногенно и, следовательно, может использоваться в качестве селектора. Эта возможность была проверена и подтверждена путем подсчета соотношения красных и белых среди морщинистых колоний в том же опыте в потомстве диплоида П67. Полученные цифровые соотношения представлены в табл. 4. Ген, ответственный за морфологию колонии, был обозначен *rgh* (rough).

Таблица 3

Расщепление по морфологии колонии среди односпоровых клонов—потомков диплоида П67, отобранных с помощью селектора—красной окраски колоний

Число клонов	Гладкие	Морщинистые
Получено . . .	55	46
Ожидалось . . .	50,5	50,5

$$\chi^2 = 0,80 \quad 0,50 \quad p > 0,30$$

Таблица 4

Расщепление по потребности в аденине (по окраске колонии) среди односпоровых клонов—потомков диплоида П67, отобранных с помощью селектора «морщинистой колонии»

Число клонов	<i>ad⁺</i>	<i>ad</i>
Получено	45	46
Ожидалось . . .	45,5	45,5

$$\chi^2 = 0,01 \quad p > 0,90$$

Каждый из двух вариантов описанного метода имеет свои преимущества при использовании для тех или иных целей. Так, элиминация вегетативных клеток, присутствующих в спорулирующей культуре, позволяет получить практически неограниченную выборку, состоящую только из односпоровых клонов: при этом облегчается проведение генетического анализа диплоидов, дающих мало жизнеспособных спор. Предлагаемый метод разрешает выявить потенциальные генетические возможности слабофертильных производственных рас дрожжей и выделить из них гаплоиды для селекционных целей.

Введение маркеров—селекторов расширяет возможности генетического анализа у дрожжей. Генетические селекторы используются при анализе расщепления у ряда микроорганизмов, в частности *Aspergillus nidulans* (Pontecorvo, 1953) и *Escherichia coli* (Lederberg, 1947). Характер их применения различен в зависимости от особенностей жизненного цикла изучаемого организма. В генетическом анализе расщепления дрожжей селекторы пока не применялись.

У дрожжей в качестве селекторов могут быть выбраны любые рецессивные легко выявляемые мутации, например мутации красной окраски колонии, которые можно выделить в результате воздействия мутагенов. Значительное усовершенствование метода может быть достигнуто при применении в качестве селектора рецессивных мутаций устойчивости или рецессивных супрессоров пищевых потребностей.

Рассмотрим генетический анализ у дрожжей с использованием селекторов. Обозначим рецессивный селектор s , альтернативный признак S . Предполагается, что это различие обусловлено одним геном.

Если родительские формы, от скрещивания которых происходит анализируемый гибрид, отличаются по какому-либо одному (a_1 и a_2) или двум признакам (a_1b_1 и a_2b_2), то в потомстве среди аналогичного класса (s) может наблюдаться различное расщепление по признакам, от генетической обусловленности этих признаков. Выводы, полученные в табл. 5. При их рассмотрении предполагается, что споры, проявляющие альтернативные признаки, обладают одинаковой жизнеспособностью.

Таблица 5

Анализ расщепления при использовании селекторов

№	Скрещивание	Расщепление среди s	Интерпретация
1	$Sa_1 \times sa_2$	$1a_1:1a_2$	Признак s обусловлен одним геном, не сцепленным с s
2	То же	Все a_1	Признак s обусловлен одним геном, сцепленным с s
3	" "	Все a_2	Признак s обусловлен одним геном, сцепленным с s
4	" "	То же	Признак s обусловлен одним геном, сцепленным с s
5	" "	$a_1 > a_2$	Признак s обусловлен несколькими взаимодействующими генами
6	" "	$a_2 > a_1$	Признак s обусловлен несколькими взаимодействующими генами
7	" "	То же	Признак s обусловлен несколькими взаимодействующими генами
8	$Sa_1b_1 \times sa_2b_2$	$1a_1b_1:1a_1b_2:1a_2b_1:1a_2b_2$	Гены обоих признаков не сцеплены ни друг с другом, ни с селектором
9	То же	$(a_1b_1 + a_2b_2) > (a_1b_2 + a_2b_1)$	Гены обоих признаков сцеплены друг с другом

В добавление к таблице следует сказать, что различить случаи 4 и 6 можно двояко. Во-первых, можно использовать другой селектор, не сцепленный с первым. Во-вторых, можно провести другое скрещивание, в котором родители обнаруживают рецессивную комбинацию признаков. Если характер расщепления при этом не изменился, то следует признать наличие цитоплазматического наследования соответственно в первом случае 3 или взаимодействие генов во втором 6.

В заключение нужно сказать, что предложенный метод анализа может применяться для установления сцепления и при анализе наследования количественных признаков, но особенно будет полезен при изучении расщепления в потомстве гибридов с низкой жизнеспособностью спор.

ВЫВОДЫ

1. Разработанная методика, основанная на использовании фермента пищеварительного сока, разрушающего оболочки асков, при уничтожении вегетативных клеток этиловым спиртом, позволяет проводить массовое выделение одиночных спор дрожжей.

2. Анализ расщепления в потомстве гибридов дрожжей может проводиться при использовании генетических селекторов для отбора односпоровых клонов.

3. Как показано предложенным методом анализа, мутантный признак дрожжей «морщинистая колония» наследуется моногенно.

ASCOSPORE ISOLATION AND GENETIC ANALYSIS IN YEAST WITHOUT MICROMANIPULATOR

I. A. Zakharov and S. G. Inge-Vechtomov

A new method of isolation of yeast spore population for genetic analysis has been developed. The method is based on digestion of ascus wall with the snail crop juice and on selective elimination of vegetative cells by treatment with 33.6% ethyl alcohol.

Use of the visible selector genes for detection of the monospore clones makes the method more suitable. Application of the new method to genetic analysis of "roughness" in colony morphology proved the monogenic inheritance of this character.

ЛИТЕРАТУРА

- Захаров И. А. 1961. В сб.: Исследования по генетике, I. Изд. ЛГУ: 38—47.
Инге-Вечтомов С. Г. 1963. Вестник ЛГУ, 21: 117—125.
Инге-Вечтомов С. Г., И. А. Захаров. 1963. «Природа», 11: 105—106.
Emswiler H. Gutz. 1958. Zs. Naturforsch., 13: 647.
Lederberg J. 1947. «Genetics», 32: 505.
Johnston J. a. R. Mortimer. 1959. J. bact., 78: 292.
Pontecorvo G. 1953. Adv. genetics, 5: 141—238.
Winge O. a. Laustsen O. 1938. C. R. lab. Carlsberg, ser. physiol., 22: 235—244.
-